

Glycolic acid 국소도포가 무모생쥐의 표피내 사이토카인 및 칼슘이온 기울기에 미치는 영향에 관한 연구

한양대학교 의과대학 피부과학교실, 연세대학교 의과대학 피부과학교실*

고주연 · 정세규* · 이승현* · 이창우

=Abstract=

The Effects of Topical Glycolic Acid on the Expression of Epidermal Cytokines and Epidermal Calcium Gradient of Hairless Mice

Joo Youn Ko, M.D., Se Kyoo Jeong*, Seung Hun Lee, M.D.* Chang woo Lee, M.D.

Department of Dermatology, Hanyang University College of Medicine, Seoul, Korea,

Department of Dermatology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea*

Background: Although the topical application of glycolic acid (GA) could possibly exert some effects on the normal epidermal permeability function, the exact effects and its mechanism of action have not been well documented.

Objective: This study was conducted to investigate the effects of GA on the expression of epidermal cytokines and to clarify its chelation effect on the epidermal calcium ions, which are known to control the secretion of lamellar bodies.

Methods: After topical application of 70% GA aqueous solution on the flank of hairless mice, the expression of epidermal IL-1 α and TNF- α was assessed and the change of epidermal calcium ions was evaluated.

Results: The results could be summarized as the following: (1) real time reverse transcriptase polymerase chain reaction and immunohistochemical staining studies showed increases in mRNA and protein expression of epidermal IL-1 α and TNF- α ; (2) the GA reduced intracellular calcium ion concentrations *in vitro* and resulted in the loss of epidermal calcium gradient *in vivo*.

Conclusion: These results suggest that, like iontophoresis or sonophoresis, GA could influence the skin's barrier homeostasis, possibly by lowering the epidermal calcium ions.

(Korean J Dermatol 2004;42(3):290~299)

Key Words: Glycolic acid, Skin barrier, Epidermal cytokine, Epidermal calcium ion

서 론

피부장벽(skin barrier)은 피부 밖으로 수분과 전해질의 손실을 억제하는 장벽의 역할을 함으로써 표피의 건조화

를 막고 표피가 정상적인 생화학적 대사를 할 수 있는 환경을 제공하며, 외부의 여러 해로운 자극이나 물질이 인체 내부로 침투 또는 경피흡수되는 것을 방지하는 인체 방어기전의 제일선 역할을 담당하고 있는 중요한 구조로서 표피의 가장 바깥 구조인 각질층이 이 기능을 담당한다¹⁻⁵.

Glycolic acid (GA) 등을 이용한 화학박피술은 주로 표피의 재생 및 진피 연결조직의 재구성을 통하여 피부를 재생하기 위한 방법으로서 최근 피부과 영역에서 많이

〈접수: 2003년 12월 3일〉

교신저자: 이창우

주소: 133-792 서울 성동구 행당동 17번지

전화: 02)2290-8434 Fax: 02)2291-9619

E-mail: cwlee@hanyang.ac.kr

Table 1. The sequences of primers and probes

	IL-1 α	TNF- α	GAPDH
Forward primer	5'-attcgatggatcagcacct	5'-ccgatgggttgcacct	5'-atcccagagctgaacg
Reverse primer	5'-tcctcccgacgagta	5'-ggactccgcaaaagtct	5'-gaagtgcgcaggagaca
Hybridization probe (FL)	5'-aggatgtggacaaacac tatctcag	5'-cccgactacgtgtcct	5'-tggcctccgtgtcctacc
Hybridization probe (LC)	5'-ccacatggtaaatgacc tgcaac	5'-ccccacccgtcagccg	5'-caatgtgtccgtcgtggatct

사용되고 있으며, 일반적으로 피부손상이 미치는 영역에 따라 크게 표층, 중층, 심층박피로 분류된다⁶⁻¹⁰. 이 중 표층박피술에 가장 흔히 사용되는 물질인 alpha hydroxy-acids (AHAs)는 과립층에서 각질세포들간의 연결을 약화시키고 새로운 표피의 재상피화를 촉진시키는 각질용해작용을 하며¹¹⁻¹³, 진피에 대한 효과로 교원질의 증가와 점다당질(glycosaminoglycan)의 증가 등을 유발할 수 있다고 알려져왔다¹²⁻¹⁵. 최근 AHAs는 이러한 각질용해작용 이외에 피부장벽 기능에도 영향을 미치는 것으로 알려졌으며, 몇몇 연구에 따르면 AHAs를 국소적으로 도포하였을 때 경표피수분손실(transepidermal water loss, TEWL)량은 정상 피부에서와 비교하여 증가되지 않으나 전자현미경적 관찰에서 층판소체(lamellar body)의 분비를 증가시킨다고 하였다¹⁶⁻²⁰. 또한 AHAs가 칼슘이온을 칼레이트화(chelation)하여 농도를 변화시킬 수 있다는 물리화학적 특성을 토대로 인체에 국소도포된 AHAs 용액이 표피내 칼슘이온 농도의 변화를 가져올 수 있다는 가설이 제시된 바 있다²¹. 그러나 아직까지 AHAs가 피부장벽에 미치는 영향과 그 작용기전에 대한 연구가 부족한 실정이다.

연구자는 가장 대표적인 AHAs 제제인 GA의 국소도포가 표피내 사이토카인 발현 및 표피내 칼슘이온 기울기에 미치는 영향에 대해 살펴보고 이를 통해 피부장벽에 대한 GA의 작용기전을 알아보려고 하였다. 이를 위해 우선 70% GA 용액을 무모생쥐(hairless mouse)의 배부에 도포한 후, 시간에 따른 TEWL의 변화를 살펴보았고 실시간 역전사효소 중합효소연쇄반응(real time reverse transcriptase polymerase chain reaction, real time RT-PCR) 및 면역조직화학염색(immunohistochemical staining)을 통한 표피내 IL-1 α 와 TNF- α 의 발현도 변화를 관찰하였다. 그리고 표피내 칼슘이온에 대한 GA의 작용을 규명하기 위하여 배양된 각질형성세포를 이용하여 시험관내(*in vitro*)에서 세포내 칼슘이온 농도의 변화를 측정하였고, 생체내(*in vivo*)에서 calcium ion-capture cytochemistry를 시행하여 GA 도포부위의 표피내 칼슘이온 기울기의 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 재료

생후 8-12주된 암컷 무모생쥐(female hairless mouse, Hr/Hr)를 동일한 표준사료로 사육한 후 실험에 사용하였다.

GA는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, 70% 농도(pH 0.5)가 되도록 증류수에 희석하여 사용하였다.

2. 실험방법

무모생쥐의 배부에 둥근 면봉을 사용하여 70% GA 용액을 약 2-3회 도포하고 2분 후에 10% 탄산수소나트륨 용액으로 중화하거나 물로 제거한 후 다음과 같은 실험을 수행하였다.

1) TEWL의 변화관찰

실내온도 25°C, 상대습도 50-60%인 항온항습 조건에서 4% chloral hydrate를 복강내에 주사하여 무모생쥐를 마취시켰으며, Tewameter TM210® (Courage & Khazaka, Cologne, Germany)를 이용하여 TEWL을 측정하였다. 그리고 측정 후 3, 6, 12, 24시간에 측정하였다.

통계적 유의성은 Student's t-test를 사용하여 실시하였으며, 유의수준은 0.05 미만으로 설정하였다.

2) 표피내 사이토카인 발현도의 변화관찰

용액을 도포한 부위에서 측정 직전 및 직후 그리고 3, 6, 24시간 후 채취한 조직을 이용하여 표피내 대표적 사이토카인인 IL-1 α 와 TNF- α 에 대한 real time RT-PCR과 면역조직화학염색을 시행하였다.

(1) Real time RT-PCR

① RNA의 분리 및 정량

조직을 얻은 직후 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid-phosphate buffered saline (EDTA-PBS, pH 7.4) 용액을 이용하여 37°C에서 35-45분간 반응시켜 표피층을 분리하고, TRIzol® reagent (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)를 이용하여 분리된 표피 조직에서 RNA를 분리하였다. 이후 분광광도계(UV-Spectrophotometer; Pharmacia LKB·Ultraspec, IL, USA)를 이용하여 분리된 RNA의 농도를 측정하고 다음 실험에 사용하였다.

② 역전사(reverse transcription)반응

RNA PCR kit Ver. 2.1® (TaKaRa Shuzo Co. Shiga, Japan)을 이용하여 표피에서 분리한 mRNA에 대한 역전사반응 실험을 시행하였다. 1 μ g mRNA를 oligo-dT primer

와 0.25 units/ μ L 농도의 reverse transcriptase를 사용하였고, PTC DNA engine system (MJ Research, Inc. Watertown, MA, USA)에서 역전사 반응을 수행하였다.

(3) 중합효소연쇄반응

LightCycler Probe Design Software를 이용하여 각각의 시동물질(primer)과 탐색자(probe)를 Table 1과 같이 설계하였고, 사이토카인 양의 차이를 정량하기 위하여 내인성 조절유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G APDH)를 이용하여 각 시료에서의 사이토카인 mRNA의 상대적인 값을 측정하였다. 중합효소반응은 LightCycler-FastStart Master Hybridization Probes kit[®] (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)을 사용하여 LightCycler[®]에서 시행하였다. 실험결과는 각각의 시료에서 측정된 교차점(crossing point)에 해당되는 증폭횟수(cycle number)를 이용하여 계산하였다.

(2) 면역조직화학염색

조직을 얻은 즉시 OCT compound (Tissue-Tek[®])를 이용하여 포매하고 60°C에서 냉동 보관한 조직을 냉동절편기를 이용하여 약 5 μ m의 두께로 박절하여 poly-L-lysine (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA)으로 처리한 유리 슬라이드에 부착시킨 후 공기 중에서 1시간 건조시키고 pH 7.4로 조절된 PBS를 이용하여 OCT compound를 제거한 후 4°C에서 아세톤에 고정하였다. 0.03% H₂O₂를 함유한 PBS에 5분간 반응시켜 내재성 과산화효소(peroxidase)를 제거하였고 avidin으로 결합된 fluorescein isothiocyanate (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA)를 이용하여 기존 조직내의 biotin에 결합시켰다. 5% 정상 혈청에 약 20분간 반응시킨 후 각각 1:500, 1:300으로 희석한 IL-1 α 에 대한 1차 항체(rabbit anti-human antibody; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)와 TNF- α 에 대한 1차 항체(goat anti-mouse antibody Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 실온에서 1시간 반응시켰다. 이 후 IL-1 α 의 2차 항체인 biotin이 결합된 swine anti-rabbit IgG (DAKO, Carpinteria, CA, USA)과 TNF- α 의 2차 항체인 biotin이 결합된 rabbit anti-goat IgG (DAKO, Carpinteria, CA, USA)를 각각 가하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 최종적으로 과산화효소가 부착된 streptavidin (DAKO, Carpinteria, CA, USA)에 30분간 반응시키고 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAKO, Carpinteria, CA, USA)을 가하여 적정시간 정색반응을 시킨 후, Mayer's hematoxylin에 10초간 대조염색하고 Canada balsam으로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

3) 세포내 칼슘이온 농도 및 표피내 칼슘이온 기울기의 변화 관찰

(1) 세포내 칼슘이온 농도의 측정^{22,23}

① 각질형성세포의 배양

무모생쥐를 희생시킨 후 즉시 피부를 분리하여, 산소로 포화시켰고 미리 냉각시킨 bovine serum albumin (BSA)을 포함하고 있는 HCO³⁻-free 용액에 넣고 가능한 한 빠른 시간내에 피하지방 및 진피 결체조직으로부터 표피를 제거하였다. 표피를 잘게 썰어 미세절편을 만든 후 실리콘을 도포한 시험관(siliconized flask)에 넣은 후 60 U/mL의 collagenase를 포함하고 있는 15 mL의 용액을 이 시험관에 넣고 계속해서 100% 산소를 공급하면서 37°C로 지하고 있는 shaking water bath 속에서 일정한 속도로 흔들어 주면서 1시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 조직절편을 collagenase를 포함하지 않은 용액으로 3회 씻은 후 5 mL 피펫으로 조직절편을 다시 한번 분리하고 nylon-mesh를 통과해 나온 세포들을 원심분리하였다. 이 과정을 3회 반복하여 얻어진 세포들을 3 mL의 용액에 넣고 계속하여 산소를 공급하였다.

② 세포내 Fura-2의 측적 및 칼슘이온 농도의 측정

배양된 각질형성세포 3 mL를 포함하고 있는 용액에 최종농도가 2 μ M이 되도록 Fura-2/AM을 넣고 실온에서 30분 동안 산소를 제공하면서 세포내에 측적시킨 후, HEPES-buffered 용액(130 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 1 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgSO₄, 1.5 mM CaCl₂, 10 mM HEPES-Na, 10 mM HEPES free acid, 25 mM NaHCO₃, 10 mM D-glucose, pH 7.4)에 H₂O₂를 넣고 분당 2 mL의 속도로 흘려주면서 세포내의 칼슘이온 농도의 변화를 측정한다.

세포내 칼슘이온 농도를 측정하기 위하여 흥분파장(excitation wavelength)을 340 nm와 380 nm가 반복되도록 해주었고 방출파장(emission wavelength)은 510 nm가 되도록 하였으며, 변화의 값을 Grynkiewicz 식에 따라 다음과 같이 산정하였다²².

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = \text{KD} \cdot S_{f2}/S_{b2}[(R - R_{\min})/(R_{\max} - R)]$$

이 때 KD는 Fura-2의 K_D 값, R은 측정된 340/380 fluorescence 비율 값, R_{min}은 2.5 mM EGTA에 반응한 PC12 세포의 340/380 fluorescence 비율 값(F₃₄₀/F₃₈₀), R_{max}는 25 μ M ionomycin에 반응한 340/380 fluorescence 비율 값, S_{f2}는 R_{min} 때 380 nm의 형광강도 값, 그리고 S_{b2}는 R_{max} 때 380 nm의 형광강도 값을 나타낸다.

(2) Calcium ion-capture cytochemistry²⁴

조직을 얻은 즉시 2% glutaraldehyde, 2% formaldehyde, 90 mM potassium oxalate 1.4% sucrose로 조성된 고정액에 담구어 4°C 냉장고에 보관하고, 2시간 후에 조직을 0.5 mm³으로 세절한 다음 얼음조각 위에서 놓고 하루밤 동안 냉장고에서 고정하였다. 다음날 고정액은 제거하고 조직을 다시 1 mL OsO₄ (4%)와 3 ml potassium pyroantimonate

stock 용액(2%)이 혼합된 후고정액에 담구어 얼음위에서 2시간 동안 후고정하였다. 이후 모든 후고정 조직들을 냉증류수(pH 10.0)에 10분간 수세한 다음 0.1 M cacodylate buffer로 10분간 행구고 50%, 70%, 95%, 100% 에탄올로 각각 탈수하였으며, 통상적인 방법으로 epon에 포매시킨 후 세절편하여 통상적 방식의 uranyl acetate와 lead citrate로 염색하지 않고 투과전자현미경으로 표피세포 전충을 관찰하였다.

결 과

1. TEWL의 변화

70% GA를 이용하여 표층박피술을 시행한 후 24시간동안 관찰한 결과, 중화제의 사용 여부에 관계없이 TEWL

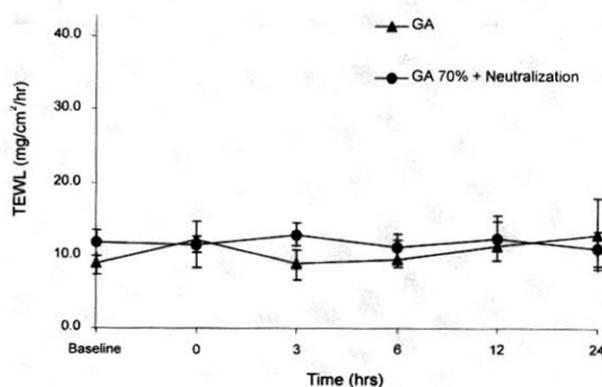
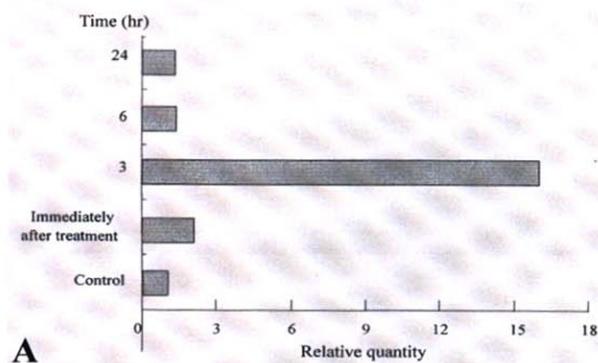


Fig. 1. The changes of transepidermal water loss (TEWL) value in 70% glycolic acid (GA) treated group (N=10). Note that use of GA solution did not affect the TEWL changes. All data show $p>0.05$ with two-tailed Student's t-test.



수치에 있어서 통계학적으로 유의한 변화를 나타내지 않았다($P>0.05$; Fig. 1).

2. 표피내 사이토카인 발현도의 변화

Real-time RT-PCR 실험결과, 70% GA를 도포 후 IL-1 α , TNF- α 의 mRNA 양의 증가가 관찰되었다. 특히 도포 3시간 경과 후 IL-1 α mRNA 발현이 약 25배 증가를 보였고, TNF- α 의 mRNA도 약 15배 증가를 보여 가장 최고의 증가소견을 보였다(Fig. 2).

면역조직화학염색 결과에서도 IL-1 α , TNF- α 의 발현이 70% GA를 국소적으로 도포한 후 서서히 증가하기 시작하여 도포 6시간 경과 후에 각 사이토카인의 발현도가 최고에 이른 후 24시간 후에는 감소되는 소견이 관찰되었다(Fig. 3, 4).

3. 세포내 칼슘이온 농도 및 표피내 칼슘이온 기울기의 변화

시험관내에서 배양된 각질형성세포내의 칼슘이온 농도의 변화를 관찰한 결과, 300 mM의 GA를 가한 후 세포내 칼슘이온 농도의 감소를 확인할 수 있었고(Fig. 5A), 1 mM CaCl₂를 가한 두 번째 실험에서는 매우 서서히 세포내 칼슘이온 농도가 회복되는 소견이 관찰되었다(Fig. 5B).

생체내에서 표피내의 칼슘이온 기울기의 변화를 관찰한 결과, 칼슘이온의 농도는 과립총에서 높은 양상을 보이고 기저총에서 상대적으로 적은 양상을 보이는 도포 전의 정상적인 칼슘이온 분포와는 달리 도포 직후 과립총내 칼슘이온의 소실로 표피내 칼슘이온 기울기가 변화하기 시작하고 도포 3시간 후 보다 현저해지며, 도포 6시간 경과 후에는 표피내 칼슘이온 기울기가 부분적으로 회복되는 소견을 보였다(Fig. 6).

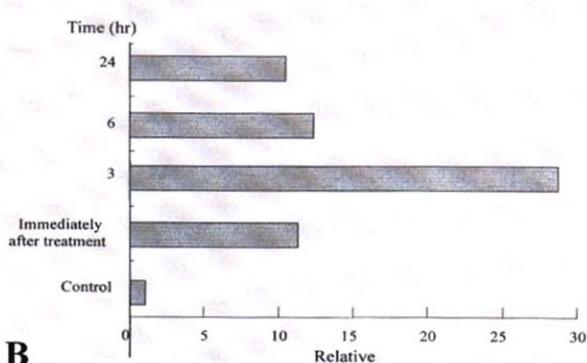


Fig. 2. Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) for IL-1 α and TNF- α . The mRNA expressions of IL-1 α (A) and TNF- α (B) were increased in the 70% glycolic acid treated skin.

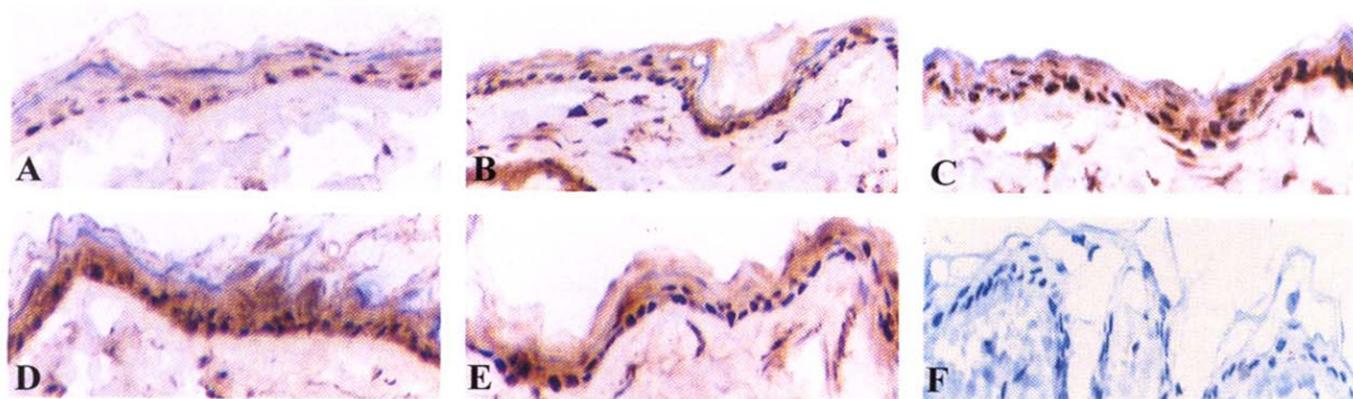


Fig. 3. Immunohistochemical staining for IL-1 α glycolic acid treated skin. The expression for IL-1 α was significantly increased at 6 hours after 70% glycolic acid application (A, pretreatment; B, Just after treatment; C, 3-hour later; D, 6-hour later; E, 24-hour later; F, negative control stained in absence of primary antibody) ($\times 400$).

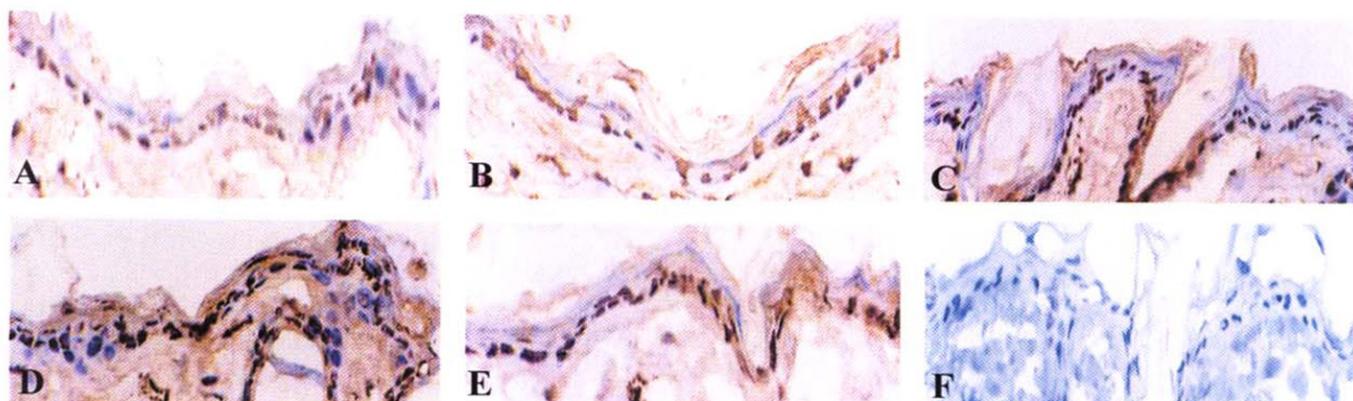


Fig. 4. Immunohistochemical staining for TNF- α glycolic acid treated skin. Like IL-1 α , the expression for TNF- α was significantly increased at 6 hours after 70% glycolic acid application (A, pretreatment; B, Just after treatment; C, 3-hour later; D, 6-hour later; E, 24-hour later; F, negative control stained in absence of primary antibody) ($\times 400$).

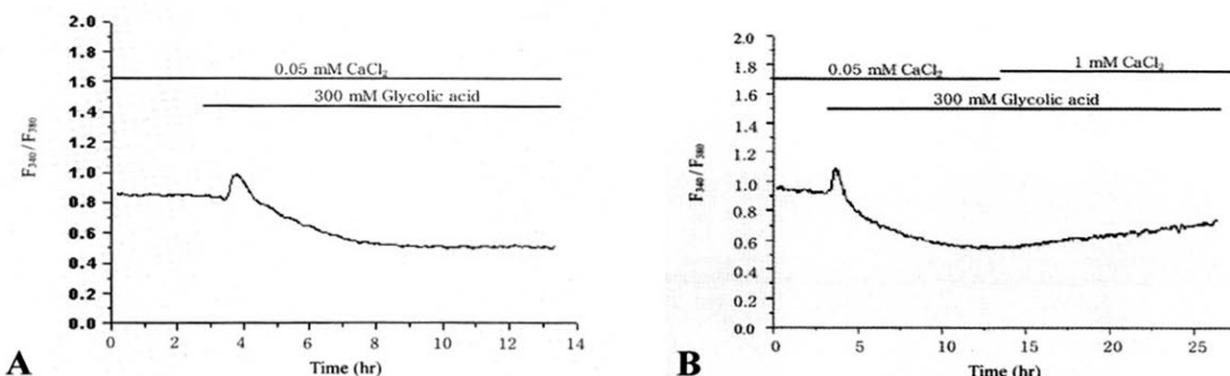


Fig. 5. In vitro measurement of intracellular free Ca $^{2+}$ concentration. Glycolic acid inhibited intracellular free Ca $^{2+}$ concentration by the chelation effect in primary cultured murine keratinocytes. A and B: records of ratios of fluorescence at 340 nm to 380 nm (F₃₄₀/F₃₈₀) from fura-2loaded keratinocytes, A with 300 mM glycolic acid loading, B with 300 mM glycolic acid + 1 mM CaCl₂ loading.

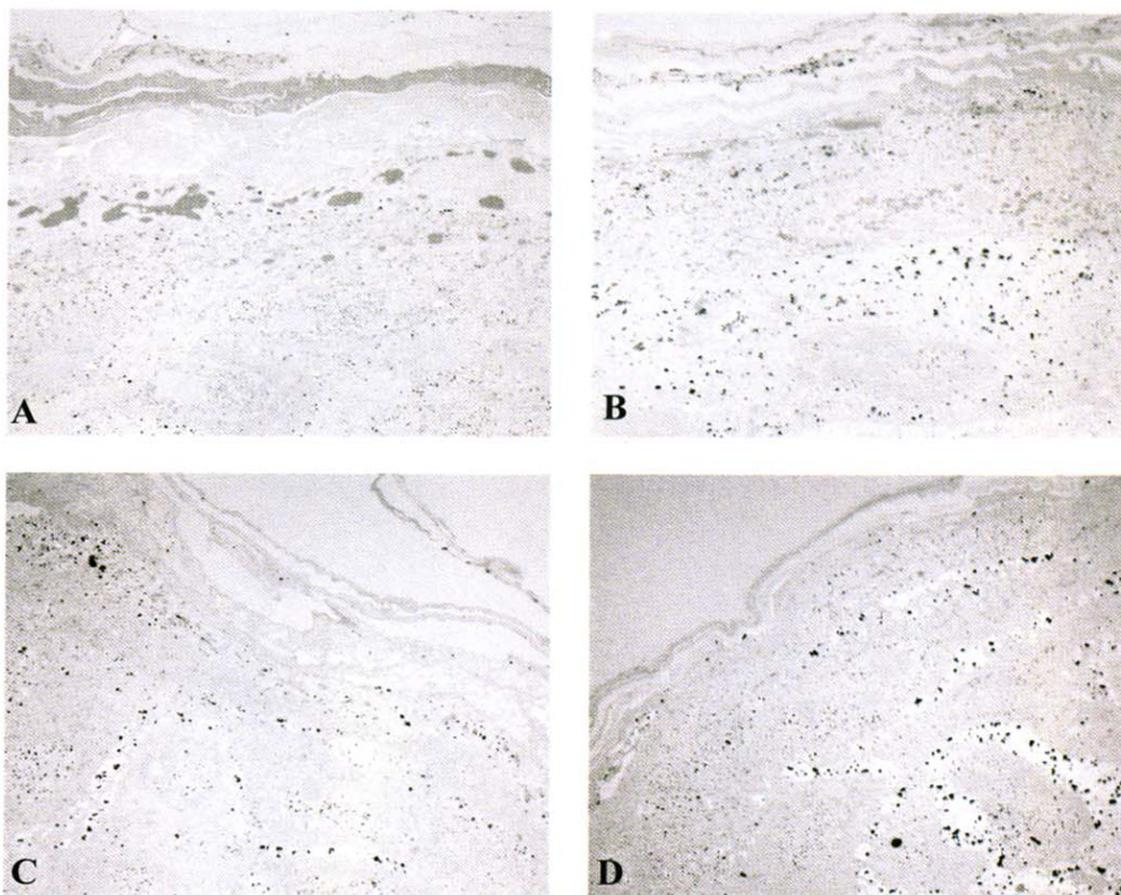


Fig. 6. The calcium distribution in the epidermis treated with 70% glycolic acid. The glycolic acid treated skin showed the loss of calcium gradient through the epidermis immediately after application and to an even greater extent at 3 hours after application. After 6 hours, the partial recovery of epidermal calcium gradient was observed (A, pretreatment; B, immediately after glycolic acid treatment; C, 3-hour later; D, 6-hour later) (OsO₄ postfixation and unstained, $\times 5,000$).

고 찰

GA를 비롯한 AHAs 제제는 화장품이나 의약품에 포함되어 오랫동안 각질제거, 보습, 연화 등의 목적으로 사용되어 왔으며²⁵, 1990년대 이후로는 화학박피술에도 활발히 이용되면서 어린선을 포함한 과각화증, 여드름, 과색소침착, 광노화피부, 미세주름 등의 치료에 매우 효과가 있는 것으로 알려졌다^{7,12,26-30}. AHAs가 피부에 미치는 영향의 정확한 작용기전은 아직 알려져 있지 않으나, 표피와 진피에 각각 서로 다른 영향을 미치는 것으로 보여진다. 표피의 경우, AHA는 과립층에서 각질형성세포들간의 연결을 약화시키고 새로운 표피의 재상피화를 촉진시키는 각질용해작용이 있으며, 이러한 과정을 통하여 비정상적으로 두꺼워진 각질층을 정상화하는 것으로 알려져 있다^{11-13,25,26}. 또한 진피에 대한 효과로는 교원질의 증가와 점다당질

(glycosaminoglycan)의 증가 등이 보고된 바 있다^{6,14,15,25}. 또한 최근 피부장벽에 미치는 영향에 관한 보고에서 GA의 국소도포가 각질층의 용해작용은 있으나 피부장벽 기능을 나타내는 TEWL을 증가시키지 않으며, 미세구조상의 조직의 괴사나 변성은 초래하지 않으면서 피부장벽 회복의 징후인 표피내 충판소체의 분비는 증가시킨다고 발표하였다¹⁶⁻²⁰. 이는 GA가 피부에 미치는 영향이 단순한 부식성 물질로서의 각질층의 제거가 아닌 다른 기전을 통해 이루어질 수도 있을 것이라는 의구심을 가지게 한다. 이에 연구자는 본 실험을 통해 GA 도포후 일어나는 각질형성세포에서 분비되는 가장 대표적인 사이토카인인 IL-1 α 와 TNF- α 의 발현 및 칼슘이온 기울기의 변화에 대해 살펴보았다.

최근 연구에 의하면 IL-1 α 나 TNF- α 와 같은 사이토카인의 증가가 표피증식을 유발하는 직접적인 신호로 작용

한다고 보고되고 있다³¹. 한편 피부장벽의 급성 손상 후 표피내 사이토카인인 TNF- α , IL-1 α , IL-1r α , IL-1 β , GM-CSF 등의 mRNA 양이 증가한다고 보고되고 있으며³²⁻³⁶, 이는 피부장벽의 손상이 사이토카인의 분비를 증가시켜 표피증식을 유발한다는 것을 시사한다. 그러나 이들 TNF- α , IL-1 α , IL-1r α 의 mRNA의 증가가 수분불투파막에 의한 피부밀폐에 의해 억제되지 않는 것으로 관찰되었으며^{34,36}, 따라서 TEWL의 변화보다는 표피손상과 연관되어 사이토카인 분비가 조절되는 것으로 생각되고 있다. 또한 이온삼투요법(iontophoresis)을 무모생쥐의 피부에 시행하여 피부장벽의 손상없이 표피내 칼슘이온 기울기만을 변화시킨 연구에서^{31,37} 표피내 IL-1 α , TNF- α , 그리고 TGF- β 의 발현증가가 확인되면서 피부장벽의 손상보다는 칼슘이온 기울기의 변화가 사이토카인 발현에 직접적으로 작용함이 밝혀진 바 있다. 본 연구결과, GA 도포 후 TEWL의 증가없이 표피내 IL-1 α 와 TNF- α 의 mRNA 발현증가와 단백질 수준에서의 발현증가를 관찰되었고, 이를 통해 GA가 TEWL 변화는 초래하지 않는 정도의 표피손상만을 유발하였거나 혹은 표피내 칼슘이온 기울기의 변화를 유발하여 표피내 사이토카인을 변화시켰을 가능성을 확인할 수 있었다. 또한 이는 본 실험에 사용된 GA가 표피내 사이토카인의 증가를 통해 표피증식을 유도하고 결국 재상피화를 초래할 수도 있는 제제라는 것을 의미한다.

피부장벽으로서의 역할을 수행하는 각질층은 두 가지 주요 구성성분으로 이루어져 있으며, 이 중 하나는 단백질로 이루어진 각질세포이며 또 다른 하나는 각질세포간 지질이다^{38,39}. 현재까지의 연구에 의하면 이들 중 각질세포간 지질이 피부장벽으로써의 역할 수행에 가장 중요한 것으로 생각되고 있으며^{1-5,40}, 이는 대부분 각질층과 과립층 사이에서 충판소체의 세포외유출(exocytosis)에 의해 세포간격으로 분비된다^{1-5,38-41}. 피부장벽이 손상되면 이러한 충판소체의 분비가 증가하는 것이 피부장벽을 회복하고 강화시키는 첫 번째 반응이며, 현재까지의 연구들에 의하면 표피내의 여러가지 인자들, 특히 칼슘이온이 지질대사의 변화를 시작하게 하는 가장 중요한 신호로 생각되고 있다⁴²⁻⁴⁵. 이를 뒷받침하는 근거로써 최근 외부 전기자극에 의한 표피내 이온 기울기의 변화만으로도 피부장벽 항상성에 영향을 미칠 수 있음이 보고되었으며⁴⁶, 초음파요법(sonophoresis)⁴⁷ 및 이온삼투요법^{48,49}이 피부장벽의 손상없이 표피내 칼슘이온 기울기의 소실을 초래하여 충판소체의 분비를 증가시킨다는 보고도 있다. 이 연구들에 따르면 칼슘이온의 변화가 피부장벽 손상과 무관하게 충판소체의 빠른 분비를 가져오는 것으로 보아 칼슘이온이

충판소체 분비의 조절인자로 생각된다고 하였다.

GA는 화학적으로 칼슘이온과 퀄레이트 화합물을 이룰 수 있는 구조를 지니고 있으며, 최근 Wang은²¹ 이러한 효과를 통해 GA가 표피내의 칼슘이온을 제거함으로써 칼슘이온 기울기의 변화를 초래할 수 있다는 가설을 제시한 바 있다. 그는 국소도포된 AHAs가 퀄레이트 효과를 통해 cadherin과 같은 세포결합물질로부터 칼슘이온을 제거하여 표피내 칼슘이온 농도를 감소시키며 세포결합이 둔화되어 표피탈락을 유발한다고 보고하였다. 또한 이러한 칼슘이온의 감소는 표피에서 세포성장을 촉진하고 분화는 자연시킴으로써 새롭게 형성된 세포들이 오래 지속되고 따라서 외견상 짚어 보이는 효과를 보인다고 하였으며, 이는 AHAs의 사용이 피부노화 치료 및 방지에 도움이 된다는 기존의 인식을 뒷받침할 수 있을 것이라고 하였다^{7,12,21,29,30}. 본 연구에서는 이론적으로만 제시되었던 GA의 칼슘이온 퀄레이트 효과가 시험관내 또는 생체내에서도 존재하는지 확인하기 위해 시험관내에서 칼슘이온 농도변화에 민감하게 반응하는 염색물질인 Fura-2/AM을 이용한 실험을 수행하였고^{22,23}, 생체내에서 calcium ion-capture cytochemistry를 시행하였다²⁴. 그 결과 GA에 의한 각질형성세포내 칼슘이온 농도의 감소 및 표피내 칼슘이온 기울기의 소실이 관찰되었다. 이는 GA가 이온삼투요법이나 초음파요법과 유사하게 TEWL의 증가됨이 없이도 표피내 칼슘이온 기울기를 변화시킬 수 있는 제제로 작용함을 확인한 것이며, 앞서 기술한 표피내 사이토카인 변화가 칼슘이온 기울기의 소실로 인해 발생한 것임을 알 수 있었다. 또한 이러한 GA의 표피내 칼슘이온 퀄레이트화는 이전의 연구들¹⁶⁻²⁰에서 나타난 GA 국소도포 후 TEWL은 변화하지 않으나 충판소체의 분비는 증가한다는 사실을 설명할 수 있는 기전이 될 수 있을 것이다.

연구자는 본 연구를 통하여 GA가 표충박피제로서 사이토카인 발현의 증가를 통하여 피부재생을 초래할 뿐만 아니라, 다른 화학박피제들과는 달리 피부장벽의 기능적 손상이 없이도 표피내 칼슘이온 기울기의 변화를 초래할 수 있는 제제임을 확인할 수 있었으며, 이를 근거로 향후 피부장벽을 강화시킬 수 있는 제제로서의 GA의 사용 가능성을 확인할 수 있었다.

결 론

GA의 국소도포가 표피내 사이토카인 발현 및 표피내 칼슘이온 기울기에 미치는 영향에 대해 살펴보고 이를 통해 피부장벽에 대한 GA의 작용기전을 알아보기 위한 본 연구에서 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 70% GA 용액을 국소적으로 도포한 후 24시간동안 TEWL의 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

2. Real time RT-PCR 결과에서 70% GA 용액을 국소도포한 후 표피내 IL-1 α 와 TNF- α 의 mRNA 양이 증가하여 도포 3시간 후 최고로 증가한 뒤 다시 감소하는 소견이 관찰되었다.

3. 면역조직화학염색 결과에서 70% GA 용액을 국소도포한 후 표피내 IL-1 α 와 TNF- α 의 단백질 발현이 증가하여 도포 후 6시간 경에 최고에 이르고 서서히 다시 회복되는 소견이 관찰되었다.

4. 시험관내에서 GA에 의한 세포내 칼슘이온의 변화를 측정한 결과, 킬레이트 효과에 의한 각질세포내 칼슘이온 농도의 감소를 확인할 수 있었다.

5. 생체내에서 표피내 칼슘이온 기울기의 변화를 관찰한 결과, 70% GA 용액을 국소도포한 직후부터 표피내 과립층의 칼슘이온 기울기가 소실되고 국소도포 6시간 후 부분적으로 회복되는 소견이 관찰되었다.

이러한 실험결과를 통하여 GA는 TEWL의 증가가 없이도 표피내 사이토카인을 증가시키고 칼슘이온 기울기의 소실을 가져올 수 있는 제제임을 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

- Elias PM, Feingold KR, Fluhr JW. Skin as an organ of protection, In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, editors. Fitzpatrick's Dermatology in general medicine. 6th ed. New York: McGraw-Hill, 2003:107-118
- Feingold KR. Permeability barrier homeostasis: Its biochemical basis and regulation. Cosmet Toilet 1997;112: 49-59
- Elias PM. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. J Invest Dermatol 1983;80(Suppl 80):44-49.
- 이승현, 황상민, 최웅호, 안성구. 피부장벽. 대피지 1999;37:825-837
- Lee SH, Chung H-S, Lew W. Epidermal lipid homeostasis. Ann Dermatol 1995;7:99-111
- Moy LS, Peace S, Moy RL. Comparison of the effect of various chemical peeling agents in a mini-pig model. Dermatol Surg 1996;22:429-432
- Van Scott EJ, Ditre CM, Yu RJ. Alpha-hydroxyacids in the treatment of signs of photoaging. Clin Dermatol 1996;14:217-226
- Rubin MG. Manual of chemical peels, In: Superficial and medium depth. 1st ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1995:17-25
- Brody HJ, Monheit GD, Resnik SS, Alt TH. A history of chemical peeling. Dermatol Surg 2000;26:405-409
- Brody HJ. Chemical peeling: an updated review. J Cutan Med Surg 1999;3(Suppl 4):14-20
- Van Scott EJ, Yu RJ. Hyperkeratinization, corneocyte cohesion, and alpha hydroxy acids. J Am Acad Dermatol 1984;11:867-879
- Ditre CM, Griffin TD, Murphy GF, Sueki H, Telegan B, Johnson WC, et al. Effects of alpha-hydroxy acids on photoaged skin: a pilot clinical, histologic, and ultrastructural study. J Am Acad Dermatol 1996;34:187-195
- Dinardo JC, Grove GL, Moy LS. Clinical and histological effects of glycolic acid at different concentrations and pH levels. Dermatol Surg 1996;22:421-424
- Moon SE, Kim JA, Lee JK. Effect of glycolic acid on collagen gene expression in cultured human skin fibroblasts. Ann Dermatol 2001;13:92-95
- Bernstein EF, Lee J, Brown DB, Yu R, Van Scott E. Glycolic acid treatment increases type I collagen mRNA and hyaluronic acid content of human skin. Dermatol Surg 2001;27:429-433
- 정세규, 김산, 이은희, 최웅호, 안성구, 이승현. 화학적 박피가 피부장벽에 미치는 영향에 대한 비교연구. 대피지 2002;40:1181-1187
- Kim TH, Choi EH, Kang YC, Lee SH, Ahn SK. The effects of topical α -hydroxyacids on the normal skin barrier of hairless mice. Br J Dermatol 2001;144:267-273
- Beradesca E, Distante F, Vignoli GP, Oresajo C, Green B. Alpha hydroxyacids modulate stratum corneum barrier function. Br J Dermatol 1997;137:934-938
- Fartasch M, Teal J, Menon GK. Mode of action of glycolic acid on human stratum corneum: ultrastructural and functional evaluation of the epidermal barrier. Arch Dermatol Res 1997;289:404-409
- Rawlings AV, Davies A, Carlomusto M, Pillai S, Zhang K, Kosturko R, et al. Effect of lactic acid isomers on keratinocyte ceramide synthesis, stratum corneum lipid levels and stratum corneum barrier function. Arch Dermatol Res 1996;288:383-390
- Wang X. A theory for the mechanism of action of the α -hydroxy acids applied to the skin. Med Hypotheses

- 1999;53:380-382
22. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985;260:3440-3450
 23. Williams DA, Fogarty KE, Tsien RY, Fay FS. Calcium gradients in single smooth muscle cells revealed by the digital imaging microscope using Fura-2. *Nature* 1985; 318:558-561
 24. Menon GK, Grayson S, Elias PM. Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry. *J Invest Dermatol* 1985;84:508-512
 25. Smith WP. Epidermal and dermal effects of topical lactic acid. *J Am Acad Dermatol* 1996;35:388-391
 26. Van Scott EJ, Yu RJ. Control of keratinization with alpha hydroxy acids and related compounds. I. Topical treatment of ichthyotic disorders. *Arch Dermatol* 1974; 110:586-590
 27. Buxman M, Hickman J, Ragsdale W, Stretcher G, Krochmal L, Wehr RF. Therapeutic activity of lactate 12% lotion in the treatment of ichthyosis. *J Am Acad Dermatol* 1986;15:1253-1258
 28. Wang CM, Huang CL, Hu CT, Chan HL. The effect of glycolic acid on the treatment of acne in Asian skin. *Dermatol Surg* 1997;23:23-29
 29. Newman N, Newman A, Moy LS, Babapour R, Harris AG, Moy RL. Clinical improvement of photoaged skin with 50% glycolic acid. A double-blind vehicle-controlled study. *Dermatol Surg* 1996;22:455-460
 30. Van Scott EJ, Yu RJ. Alpha hydroxy acids: procedures for use in clinical practice. *Cutis* 1989;43:222-228
 31. 최응호, 김민정 이세원, 박원석. 피부장벽에 사이토카인의 미치는 영향. *한국피부장벽학회지* 2002;4:95-104
 32. Proksch E, Feingold KR, Mao-Qiang M, Elias PM. Barrier function regulates epidermal DNA synthesis. *J Clin Invest* 1991;87:1668-1673
 33. Wood LC, Elias PM, Calhoun C, Tsai JC, Grunfeld C, Feingold KR. Barrier disruption stimulates interleukin-1 alpha expression and release from a pre-formed pool in murine epidermis. *J Invest Dermatol* 1996;106:397-403
 34. Wood LC, Elias PM, Sequeira-Martin SM, Grunfeld C, Feingold KR. Occlusion lowers cytokine mRNA levels in essential fatty acid deficient and normal mouse epidermis but not after acute barrier disruption. *J Invest Dermatol* 1994;103:834-838
 35. Wood LC, Feingold KR, Sequeira-Martin SM, Elias PM, Grunfeld C. Barrier function coordinately regulates epidermal IL-1 and IL-1 receptor antagonist mRNA levels. *Exp Dermatol* 1994;3:56-60
 36. Man MQ, Wood L, Elias PM, Feingold KR. Cutaneous barrier repair and pathophysiology following barrier disruption in IL-1 and TNF type I receptor deficient mice. *Exp Dermatol* 1999;8:261-266
 37. 최응호, 김민정, 예병일, 안성구, 이승현. Calcium의 변화에 의한 생체 표피의 사이토카인의 발현에 관한 연구 (초록). *한국피부장벽학회지* 2000;1:88.
 38. Elias PM. Plastic wrap revisited. The stratum corneum two-compartment model and its clinical implications. *Arch Dermatol* 1987;123:1405-1406
 39. Downing DT. Lipid and protein structures in the permeability barrier of mammalian epidermis. *J Lipid Res* 1992;33:301-313
 40. Elias PM, Menon GK. Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Adv Lipid Res* 1991;24:1-26
 41. Menon GK, Feingold KR, Elias PM. Lamellar body secretory response to barrier disruption. *J Invest Dermatol* 1992;98:279-289.
 42. Mauro T, Bench G, Sidderas-Haddad E, Feingold K, Elias P, Cullander C. Acute barrier perturbation abolishes the Ca^{2+} and K^+ gradients in murine epidermis: quantitative measurement using PIXE. *J Invest Dermatol* 1998; 111:1198-1201
 43. Lee SH, Elias PM, Feingold KR, Mauro T. A role for ions in barrier recovery after acute perturbation. *J Invest Dermatol* 1994;102:976-979
 44. Menon GK, Elias PM, Lee SH, Feingold KR. Localization of calcium in murine epidermis following disruption and repair of the permeability barrier. *Cell Tissue Res* 1992;270:503-512
 45. Lee SH, Elias PM, Proksch E, Menon GK, Mao-Qiang M, Feingold KR. Calcium and potassium are important regulators of barrier homeostasis in murine epidermis. *J Clin Invest* 1992;89:530-538
 46. Denda M, Kumazawa N. Negative electric potential induces alteration of ion gradient and lamellar body secretion in the epidermis, and accelerates skin barrier reco-

- very after barrier disruption. *J Invest Dermatol* 2002;118: 65-72
47. Menon GK, Price LF, Bommannan B, Elias PM, Feingold KR. Selective obliteration of the epidermal calcium-gradient leads to enhanced lamellar body secretion. *J Invest Dermatol* 1994;102:789-795
48. Lee SH, Choi EH, Feingold KR, Jiang S, Ahn SK. Iontophoresis itself on hairless mouse skin induces the loss of the epidermal calcium gradient without skin barrier impairment. *J Invest Dermatol* 1998;111:39-43
49. 이승현, 강소군, 박태형, 최승호, 안성구, 유충배. 표피 장벽 손상 후 회복에 대한 이온영 동 효과. *대피지* 1996;34:375-380